Sonderdruck aus

ZEITSCHRIFT
FÜR
ANGEWANDTE ZOOLOGIE

In Verbindung mit

Günther Becker, Berlin; Walter Faber, Wien; Heinz Geiler, Dresden; Karl Gößwald, Würzburg; Waldemar Madel, Ingelheim; Werner Reichmuth, Berlin; Fritz Weyer, Hamburg; Fritz Zumpt, Johannesburg

herausgegeben von

KURT BECKER
Berlin-Dahlem

57. Jahrgang

Erstes Heft 1970

1970

DUNCKER & HUMBLOT / BERLIN

1. Gutachter: Prof. Ulrich
2. " Prof. Kümmel
Tag d. mdl. Prüfung: 26. 10. 69
Tag d. Promotion: 23. 2. 70

Inhaltsverzeichnis

Seite

Originalarbeiten

R. Mannesmann: Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die Darm-Symbionten von Termiten und über die regulatorischen Mechanismen bei der Symbiose. 2. Teil 1

I. Iglisch und W. Gunkel: Zur Biologie und Vektorleistung der „Schwarzen Blattläuse" 69

D. Schöneich: Hemmwirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esterasen verschiedener Stämme von Spinnmilben der Gattung *Tetranychus* 97

Buchbesprechungen 121

Beihefte der Zeitschrift für angewandte Zoologie

Herausgegeben von Heinrich Kemper

1 **Der Holz-Flohkrebs *Chelura terebrans* Philippi (Amphipoda, Cheluridae).** Morphologie, Verbreitung, Lebensweise, Verhalten, Entwicklung und Umweltabhängigkeit. Von Dr. *Helmut Kühne* und Prof. Dr. *Günther Becker*. 141 S. 1964. DM 40,—

2 **Der Rattenkönig.** Eine monographische Studie. Von Dr. *Kurt Becker* und Prof. Dr. *Heinrich Kemper*. 99 S. mit 22 Abb. 1964. DM 30,—

UNIV. LEIDEN BIBL.

(Aus dem Laboratorium für Pflanzenschutzforschung der Schering AG und dem II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin)

Hemmwirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esterasen verschiedener Stämme von Spinnmilben der Gattung *Tetranychus*[1]

Von Dörte Schöneich

(Mit 7 Abbildungen)

Einleitung

Seitdem die Spinnmilbenbekämpfung durch das Auftreten resistenter Formen erschwert wurde, ist der Resistenzmechanismus dieser Pflanzenschädlinge Gegenstand zahlreicher Untersuchungen geworden (Voss, 1962; Matsumura u. Voss, 1964, 1965; Smissaert, 1964, 1965; Helle, 1965). Danach scheint eine Veränderung der Acetylcholinesterase, also des Wirkungsortes der Phosphorsäureester, ein wesentlicher Faktor für die Organophosphatresistenz von Spinnmilben zu sein.

Die vorliegende Arbeit soll einen weiteren Beitrag zur Klärung der Resistenzphänomene bei Spinnmilben liefern. Es wurde die Wirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esterasen normaler und resistenter Spinnmilben untersucht, um festzustellen, ob eine unterschiedliche Hemmbarkeit der Enzyme beider Stämme als Resistenzursache anzusehen sei. Das Verhalten der Cholinesterasen den Hemmstoffen gegenüber stand dabei im Mittelpunkt des Interesses. Zur vergleichenden Charakterisierung der Esterasen beider Milbenstämme und zur Analyse der Inhibitorwirkung wurden z. T. enzym- und hemmkinetische Untersuchungsmethoden herangezogen. Es scheint daher angebracht, zum Verständnis des folgenden einige Begriffe aus dem Bereich der Enzymkinetik zu definieren.

Jede Enzymreaktion setzt die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes voraus ($E + S = ES$), von dessen Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit proportional abhängt. Wenn alles vorhandene Enzym als ES-Komplex vorliegt, hat die Reaktionsgeschwindigkeit ihren maximalen Wert. Die Sub-

[1] Ich danke der Firma Schering für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K. Urich, bin ich für seine Anleitung zu den Versuchen zu größtem Dank verpflichtet. Herrn Dr. W. Steinhausen und Herrn Dr. C. Kötter möchte ich für manche anregende Diskussion und für stete Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.

stratkonzentration, die aufgewendet werden muß, um die Hälfte des vorhandenen Enzyms mit Substrat abzusättigen und damit halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten, wird durch die Michaeliskonstante K_m angegeben. Diese Konstante charakterisiert die Affinität des Enzyms zum Substrat. Eine hohe Michaeliskonstante bedeutet, daß eine hohe Substratkonzentration nötig ist, um zu halbmaximaler Sättigung des Enzyms zu gelangen, d. h. die Affinität des Enzyms zum Substrat ist in diesem Fall gering. Eine niedrige Michaeliskonstante dagegen deutet auf eine größere Affinität zwischen Enzym und Substrat hin.

Die oben erörterte Abhängigkeit zwischen der Geschwindigkeit der Enzymreaktion und der Substratkonzentration faßten Michaelis und Menten in folgender Gleichung zusammen:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration [S], V_{max} = Maximalgeschwindigkeit, K_m = Michaeliskonstante. Zur graphischen Bestimmung von K_m nach Lineweaver-Burk wird diese Gleichung in eine Geradengleichung umgeformt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Bestimmt man die Reaktionsgeschwindigkeit v für verschiedene Substratkonzentrationen [S] und trägt im Koordinatensystem 1/v gegen 1/[S] auf, so erhält man demnach eine Gerade, die die Abszisse bei $-1/K_m$ schneidet. Aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate läßt sich die Maximalgeschwindigkeit V_{max} ermitteln (Webb 1963) (vgl. Abb.3).

Analog wie die Michaeliskonstante läßt sich die Inhibitorkonstante ableiten. Nimmt man an, daß auch der Inhibitor mit dem Enzym unter Komplexbildung reagiert ($E + I \rightleftarrows EI$), so gibt die Inhibitorkonstante K_i diejenige Inhibitorkonzentration an, bei der halbmaximale Sättigung des Enzyms mit dem Inhibitor vorliegt. Diese Konstante gilt daher als Maß für die Affinität eines Enzyms zum Inhibitor. Eine kleine Inhibitorkonstante bedeutet eine hohe Affinität des Enzyms zum Inhibitor, ein größeres K_i läßt auf geringere Affinität des Enzyms zum Inhibitor, ein größeres K_i läßt auf geringere Affinität schließen. Eine Möglichkeit zur graphischen Bestimmung von K_i bietet die Methode von Dixon (Webb 1963): Man bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeit v_i für verschiedene Inhibitorkonzentrationen [I] bei zwei unterschiedlichen, jeweils konstant gehaltenen Substratkonzentrationen $[S_1]$ und $[S_2]$. Für beide Versuchsreihen wird $1/v_i$ gegen [I] aufgetragen, wobei man zwei Geraden erhält. Der Abszissenwert des Schnittpunktes beider Geraden ist gleich $-K_i$ (vgl. Abb. 6 u. 7).

Bei der Wirkung eines Inhibitors auf ein Enzym unterscheidet man je nach dem Bindungsort des Hemmstoffs zwei verschiedene Hemmungstypen. Beim ersteren, dem sogenannten kompetitiven Hemmungstyp lagert sich der Inhibitor an das aktive Zentrum des Enzyms an, also an die Region des Enzymmoleküls, mit der normalerweise das Substrat reagiert. Substrat und Inhibitor konkurrieren somit um den gleichen Platz und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Affinität zum Enzym. Ein solcher kompetitiver Hemm-

Lebenslauf:

Am 14. April 1943 wurde ich als Tochter des Diplomingenieurs Adolf Schulz und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Rosenau in Berlin geboren. Im Jahre 1948 übersiedelten wir nach Detmold. Dort besuchte ich von 1949 bis 1953 die Volksschule und im Anschluß daran das Neusprachliche Mädchengymnasium. Im Februar 1962 beendete ich meine Schulzeit mit dem Abitur.

Im Sommersemester 1962 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Biologiestudium und bestand dort am 20. November 1964 das Vordiplom.

Vorlesungen in meinem Hauptfach Zoologie hörte ich bei den Herren Professoren Dr. W. Ulrich, Dr. K. Günther, Dr. F. Peus und Dr. K. Urich. Meine Lehrer in Botanik waren Herr Prof. Dr. J. Reinert und Frau Prof. Dr. Ch. Tielke.

Allgemeine Biologie und Genetik hörte ich bei Herrn Prof. Dr. H. Lüers. Bei Herrn Prof. Dr. F. Jahr, Herrn Prof. Dr. G. Manecke und Herrn Prof. Dr. K. Plieth hörte ich Grundvorlesungen in Chemie und Physikalischer Chemie. Grundkenntnisse in Physik und Mathematik wurden mir von Herrn Prof. Dr. H. Lassen und Herrn Prof. Dr. K. Überreiter vermittelt.

Im Herbst 1966 begann ich mit den Versuchen zu der vorliegenden Arbeit.

Am 14. Juni 1968 wurde ich mit dem Diplommathematiker Frank Schöneich getraut.

Hemmwirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esterasen verschiedener Stämme von Spinnmilben der Gattung Tetranychus.

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dörte Schöneich

aus Berlin

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548902_0061

stoff muß daher die Michaeliskonstante verändern, da diese ja ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat darstellt. Beim nichtkompetitiven Hemmungstyp reagiert der Inhibitor mit einer Region des Enzymmoleküls, die außerhalb des aktiven Zentrums liegt. Die Umsatzgeschwindigkeit der Enzymreaktion wird hier verändert, ohne daß die Bindung zwischen Enzym und Substrat beeinflußt wird. Die Differenzierung der beiden Hemmungstypen kann graphisch erfolgen (Webb 1963). Bestimmt man für gehemmte und ungehemmte Reaktion die Reaktionsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [S] und trägt 1/v gegen 1/[S] auf, so erhält man zwei Geraden, die bei kompetitiver Hemmung die Ordinate im gleichen Punkt schneiden. Bei gehemmter und ungehemmter Reaktion ergibt sich damit der gleiche Wert für V_{max}. Bei nichtkompetitiver Hemmung ergibt sich für beide Geraden der gleiche Schnittpunkt mit der x-Achse, also gleiche Werte für K_m. Eine solche Unterscheidung der beiden Hemmungstypen ist allerdings sehr formal. In der Praxis kommt eine rein kompetitive oder rein nichtkompetitive Hemmung kaum vor, sondern es treten als Zwischenformen meist sogenannte „gemischte" Hemmungstypen auf (vergl. Abb. 4 und 5). Die Ergebnisse der graphischen Analyse sind daher oft nicht eindeutig und müssen vorsichtig interpretiert werden.

Material und Methode

Zu den Versuchen wurden ein gegen Akarizide normalempfindlicher Stamm der gemeinen Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch sowie ein gegen Phosphorsäureester hochresistenter Stamm der Spezies *Tetranychus telarius* (= *cinnabarinus*) herangezogen. Der normalempfindliche Stamm wurde vor etwa 10 Jahren im Freiland gefunden und seitdem in den Laboratorien der Schering AG gezüchtet. Der resistente Stamm wurde der Schering AG von Herrn Prof. Dr. Dosse, Stuttgart-Hohenheim, zur Verfügung gestellt. Er wurde ursprünglich im Gewächshaus bereits als resistenter Stamm aufgefunden und anschließend mit Metasystox R weiterbehandelt, indem er etwa alle 4 Wochen einer Wirkstoffkonzentration von 0,05 % ausgesetzt wurde. Beide Spinnmilbenstämme wurden auf Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris*) gezüchtet, bei einer Temperatur von 23° C, 60 % Luftfeuchtigkeit und Dauerbeleuchtung.

Für die Bestimmungen wurden die Milben von den Blättern der Wirtspflanzen heruntergebürstet, wobei nicht nur die adulten Tiere beiderlei Geschlechts, sondern ebenso Larven, Nymphen und Eier erfaßt wurden. Die Tiere wurden anschließend gewogen und in einer Lösung von 0,04 M NaCl + 0,15 M $MgCl_2$ im Handhomogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde im allgemeinen nicht zentrifugiert, sondern direkt zur Bestimmung der Esteraseaktivitäten verwendet.

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte titrimetisch nach der pH-stat-Methode. Als Titriergerät diente eine motorgetriebene Kolbenbürette „Mikro-Dosimat" der Firma Metrohm. Zur pH-Kontrolle wurden ein pH-Meter der Firma Knick (Type 26) und Einstabmeßketten in Mikroausführung der Firma Metrohm verwendet. Das Reaktionsgefäß befand sich in einem Wasserbad konstanter Temperatur. Zum ständigen Rühren des Reaktionsgemisches wurde ein Magnetrührer benutzt. Sämtliche Geräte waren in doppelter Ausführung vorhanden, so daß Parallelmessungen durchgeführt werden konnten.

Zur Messung wurden 0,5 ml Homogenat und 0,5 ml Substrat in das Reaktionsgefäß gegeben. Bei den Hemmstoffversuchen wurden 0,5 ml Homogenat mit 0,1 ml Hemmstoff 10 Minuten präinkubiert und danach die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Substrat gestartet. Von den nicht wasserlöslichen Hemmstoffen wurden Stammlösungen angesetzt, die die Hemmstoffe in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ M in 70 % Methanol gelöst enthielten. Die für die Versuche benötigten Hemmstoffkonzentrationen wurden durch entsprechendes Verdünnen der Stammlösungen hergestellt. Die Selbsthydrolyse der Substrate wurde in Kontrollversuchen ohne Enzymlösung bestimmt und die so erhaltenen Leerwerte von den Werten für die Enzymaktivität substrahiert. Die Versuche wurden im allgemeinen bei pH 7,5 und stets bei einer Temperatur von 25° C durchgeführt. Die Gewebskonzentration betrug bei den ersten Versuchen 66 mg/ml und wurde später verdoppelt. Dieses Verdünnungsverhältnis hatte sich in Vorversuchen als günstig erwiesen.

Titriert wurde mit 0,01 n Na OH und zwar in der Weise, daß die Laugemengen bestimmt wurden, die jeweils nach gleichen Zeitintervallen zugegeben werden mußten, um den pH auf den Ausgangswert zurückzuführen. Bei den hier untersuchten Enzymaktivitäten erwies sich ein Zeitintervall von zwei Minuten als günstig. Innerhalb dieser Zeit erfolgte ein Absinken des pH-Wertes um etwa 0,1 Einheit. Die Messungen wurden im allgemeinen nach 10—15 Minuten abgebrochen, da nach dieser Zeitspanne meist ein rasches Absinken der Enzymaktivität zu beobachten war. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde zu $\pm$ 2,5 % bestimmt.

Zur Auswertung der Messungen wurde die zur Titration verbrauchte Laugemenge als Funktion der Zeit aufgetragen. Dabei resultierte im allgemeinen eine Gerade, aus deren Steigung die Enzymaktivität ermittelt wurde. Lediglich bei der enzymatischen Spaltung des Substrates Phenylacetat war der Kurvenverlauf nicht linear. Die Enzymaktivität ergab sich hier aus der Steigung der im Ausgangspunkt der Kurve angelegten Tangente.

Der internationalen Einheit der Enzymaktivität μMol/min entsprechend wurden die hier ermittelten Enzymaktivitäten in μÄquivalent/min ausgedrückt. Als Bezugswert gilt das Frischgewicht des Ansatzes. Die im folgengenden in Tabellen zusammengefaßten Werte stellen Mittelwerte aus n Einzelmessungen dar. Zu jedem Mittelwert wurde die mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert als Maß für die Streuung hinzugefügt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde nach dem t-Test überprüft, wobei P als Maß für die Signifikanz bestimmt wurde (Belitz 1960).

Folgende Substanzen wurden bei den Untersuchungen verwendet:

a) Substrate:

Acetylcholinchlorid (Merck); Methylbutyrat (Schuchardt); Triacetin (Riedel); Phenylacetat (Schuchardt); Butyrylcholinchlorid (Ega-Chemie KG); Benzoylcholinchlorid (Schuchardt); Acetyl-β-methylcholinchlorid (Schuchardt).

b) Spezifische Hemmstoffe der Cholinesterasen:

Eserin (Boehringer); Mipafox (Schering); Diisopropylfluorphosphat (Schering).

c) Akarizide:

Metasystox R (Bayer); Dibrom (Chevron Chemie Company); Gusathion A (Bayer) als Phosphorsäureester.

Mesurol (Bayer); Formetanat (Schering); Formparanat (Schering) als Carbamate.

Ergebnisse

A. Vorversuche

a) Substratkonzentrations-Aktivitäts-Kurve

Es wurde in Vorversuchen zunächst die Beziehung zwischen Enzymaktivität und Substratkonzentration untersucht. Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, tritt auch bei hohen Substratkonzentrationen keine Substrathemmung auf. Die Kurve weist kein Optimum auf, sondern zeigt den Verlauf einer Sättigungskurve. Ein solcher Kurvenverlauf ist typisch für die Butyrylcholinesterase, nicht aber für die Acetylcholinesterase, deren Vorhandensein im Spinnmilbenhomogenat nach Voss (1959, 1960, 1962) und Smissaert (1965) jedoch als gesichert gilt. Der Verlauf der Kurve ist daher wohl so zu erklären, daß im Rohhomogenat ein Gemisch beider Cholinesterasen vorliegt und daß weiterhin das Vorhandensein der Aliesterasen einen Einfluß auf den Verlauf der Kurve hat. Besonders in höheren Konzentrationen wird Acetylcholinchlorid auch von diesen unspezifischen Esterasen gespalten, so daß die Wirkung der Acetylcholinesterase überlagert wird. Um den Einfluß der Aliesterasen einzuschränken, wurde für die weiteren Versuche die Substratkonzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ M gewählt.

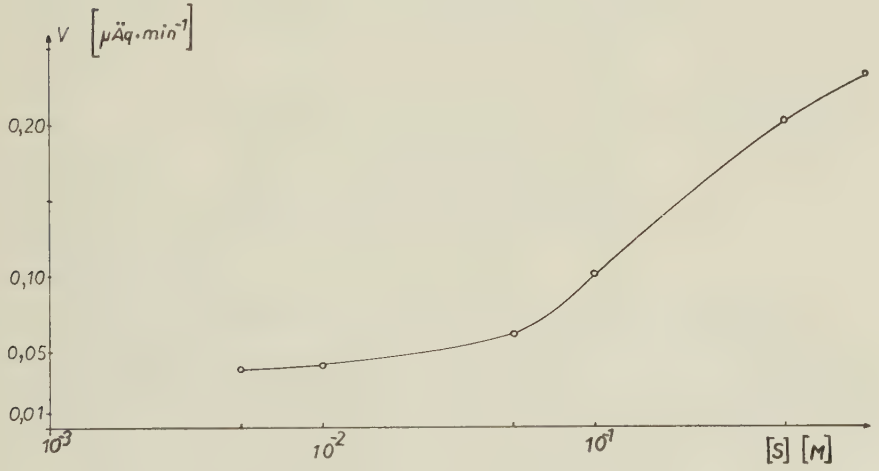


Abb. 1. Substratkonzentrations-Aktivitäts-Kurve für Acetylcholinchlorid bei pH 7,5. Die Substratkonzentration wurde logarithmisch auf der Abszisse abgetragen. Gewebskonzentration: 66 mg/ml.

b) Einfluß des pH-Wertes

Die Esteraseaktivität gegenüber Acetylcholinchlorid wurde bei pH 6,5, 7,0, 8,0 und 9,0 gemessen. Dabei wurde im Parallelversuch, am gleichen Homogenat, stets eine Probe mit pH 7,5 mitbestimmt und deren Aktivität gleich 100 % gesetzt. Dieser pH-Wert wird von VAN ASPEREN (1958, 1960) als günstig für die Esterasebestimmung angegeben. Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß der optimale Bereich für die Esterasebestimmungen zwischen pH 7,0 und 8,0 liegt, während unterhalb von pH 7,0 und oberhalb von pH 8,0 die Kurve stark abfällt. Unterhalb von pH 6,5 war keine Esteraseaktivität mehr meßbar. Die hohe Enzymaktivität bei pH 7,0 ist wohl wieder auf den Einfluß der Aliesterasen zurückzuführen, da das pH-Optimum der Cholinesterasen nach HARDEGG (1966) etwa bei pH 8,0 liegt. Für die folgenden Messungen wurde ein pH-Wert von 7,5 beibehalten.

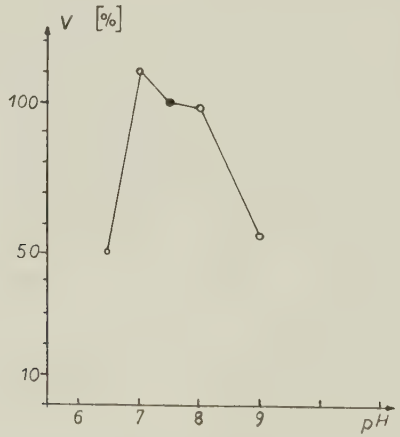


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der Esteraseaktivität v in % der bei pH 7,5 gemessenen Enzymität.

c) Verteilung der Esteraseaktivität auf die Zellfraktionen

Um Aufschluß über die Lokalisation der zu untersuchenden Esterasen im Gewebe zu erhalten, wurde in 0,25 M Rohrzucker homogenisiert und das Homogenat 20 Minuten bei 0° C und 18 000 g zentrifugiert. Danach wurde die Esteraseaktivität gegenüber Acetylcholinchlorid im Überstand und im resuspendierten Sediment bestimmt. Die Substratkonzentration bei diesen Versuchen betrug $1 \cdot 10^{-2}$ M, die Gewebskonzentration 132 mg/ml. Für die Aktivität im Überstand ergab sich aus drei Messungen ein Mittelwert von 0,0139 ± 0,0005 µÄq/min. Im resuspendierten

Sediment wurde eine durchschnittliche Esteraseaktivität von 0,0572 ± 0,0024 μÄq/min gemessen. Demnach sind etwa 80 % der Gesamtaktivität nach dem Zentrifugieren im Sediment nachweisbar.

B. Esterasespektrum bei normalen Spinnmilben

a) Differenzierung der Esterasen durch Einsatz spezifischer Substrate

Bei diesen Versuchen diente Acetylcholinchlorid als Bezugssubstrat. Die Enzymaktivität gegenüber Acetylcholinchlorid wurde im Parallelversuch am gleichen Homogenat stets mitbestimmt und gleich 100 % gesetzt. Die Esteraseaktivitäten gegenüber den anderen Substraten konnten somit in % der Aktivität gegenüber Acetylcholinchlorid ausgedrückt werden. Aus den in Tab. 1 zusammengefaßten Werten ist zu ersehen, daß die Aliesterasen im Rohhomogenat im Überschuß vorhanden sind, was auch bereits aus den Ergebnissen der Vorversuche geschlossen wurde. Ihre spezifischen Substrate werden weit stärker umgesetzt als die für Cholinesterasen spezifischen Substrate. Weiterhin wird deutlich, daß auf jeden Fall Cholinesterasen im Spinnmilbenhomogenat vorhanden sind, da die gegenüber Acetyl-β-methylcholinchlorid und Benzoylcholinchlorid gemessene Enzymaktivität ganz den beiden Cholinesterasen zugeordnet werden muß.

Tabelle 1

Esteraseaktivität normaler Spinnmilben gegenüber verschiedenen Substraten, ausgedrückt in % der Esteraseaktivität gegenüber Acetylcholinchlorid. Konzentration der Substrate: $1 \cdot 10^{-2}$ M.
Gewebskonzentration: 66 mg/ml

Substrat		n	Aktivität in %
Methylbutyrat	als spezifische Substrate der Aliesterasen	2	184 ± 7
Triacetin		2	250 ± 10
Phenylacetat		2	426 ± 18
Butyrylcholinchlorid, als spezifisches Substrat der Butyrylcholinesterase		2	78 ± 1,5
Benzoylcholinchlorid, ebenfalls als spezifisches Substrat der Butyrylcholinesterase, das aber von Aliesterasen nicht gespalten wird		2	52,5 ± 1,5
Acetyl-β-methylcholinchlorid, als spezifisches Substrat der Acetylcholinesterase		2	74,5 ± 0,5

b) Differenzierung der Esterasen durch Einsetzen spezifischer Hemmstoffe

Auch bei diesen Versuchen wurden stets zwei Proben des gleichen Homogenats parallel titriert, eine mit und eine ohne Hemmstoff. Die Enzymaktivität der Probe ohne Hemmstoff wurde gleich 100 % gesetzt.

Auf diese Weise konnte die prozentuale Hemmung ermittelt werden. Wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist, bestätigen die Hemmstoffversuche die Ergebnisse der Versuche mit den spezifischen Substraten. Sie zeigen, daß die Aliesterasen in hoher Konzentration im Homogenat vorliegen. Beim Einsetzen von Eserin, das Aliesterasen nicht hemmt, resultiert eine Hemmung von 40 %, die auf die Hemmung der Cholinesterasen zurückgehen muß. Die verbleibende Aktivität ist den Aliesterasen zuzuschreiben. Die beiden für die Butyrylcholinesterase spezifischen Hemmstoffe rufen annähernd gleiche Hemmwirkungen von etwa 20 % hervor. Damit ist bewiesen, daß auch die Butyrylcholinesterase in deutlich nachweisbaren Mengen im Spinnmilbenhomogenat vorliegt.

Tabelle 2

Hemmwirkung spezifischer Inhibitoren[1]) auf die Esteraseaktivität normaler Spinnmilben.

Substrat: Acetylcholinchlorid in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ M. Gewerbskonzentration bei der Versuchen mit Eserin 66 mg/ml, bei den folgenden Versuchen 132 mg/ml.

Hemmstoff	n	Hemmung in %
Eserin, als spezifischer Hemmstoff für Cholinesterasen	2	44,5 ± 1,0
Mipafox, als spezifischer Hemmstoff der Butyrylcholinesterase	2	18,3 ± 1,3
Diisopropylfluorphosphat (DFP), ebenfalls als spezifischer Hemmstoff der Butyrylcholinesterase	2	19,3 ± 1,7

[1]) Ein spezifischer Hemmstoff für die Acetylcholinesterase ließ sich zum Zeitpunkt der Bestimmungen nicht beschaffen.

C. Vergleich der Esteraseaktivität normaler und resistenter Spinnmilben

Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob normale und resistente Tiere Unterschiede in ihrer Esteraseaktivität aufweisen. Um die Unterschiede in der Cholinesteraseaktivität zu untersuchen, wurden Acetylcholinchlorid und Benzoylcholinchlorid als Substrate eingesetzt. Zum Nachweis unterschiedlicher Aliesteraseaktivitäten diente Methylbutyrat. Nach Tab. 3 besteht in der Esteraseaktivität normaler und resistenter Spinnmilben ein signifikanter Unterschied. Sowohl die Cholinesterase- als auch die Aliesteraseaktivität ist im resistenten Stamm um etwa 30 % erniedrigt. Die höchsten Aktivitäten ergeben sich auch im resistenten Stamm mit dem für Aliesterasen spezifischen Substrat, während von den beiden Cholinestern Benzoylcholin weniger gut gespalten wird als

Tabelle 3

Vergleich der Esteraseaktivität normaler und resistenter Tiere. Konzentration der Substrate: $1 \cdot 10^{-2}$ M. Gewebskonzentration: 132 mg/ml.

Substrat	Normale Tiere		Resistente Tiere		P
	Enzymaktivität µÄq./min	n	Enzymaktivität µÄq./min	n	
Acetylcholinchlorid	0,0662 ± 0,0018	10	0,0468 ± 0,0008	9	< 0,0002
Benzoylcholinchlorid	0,0530 ± 0,0006	10	0,0375 ± 0,001	10	< 0,0002
Methylbutyrat	0,1035 ± 0,0052	10	0,0731 ± 0,0041	10	0,0002

Acetylcholin. Bei resistenten Spinnmilben liegt demnach das gleiche Esterasespektrum vor wie bei normalen Tieren, während die Enzymaktivität unterschiedlich ist.

D. Die Wirkung von Hemmstoffen auf die Esteraseaktivität normaler und resistenter Spinnmilben

In Vorversuchen wurde zunächst ermittelt, welche Wirkstoffkonzentration im normalen Stamm etwa 50 % Hemmung hervorruft. Diese Wirkstoffkonzentration wurde dann dem Homogenat normaler und resistenter Milben zugesetzt. Es wurden stets zwei Proben vom gleichen Homogenat parallel titriert, eine Probe mit Hemmstoff und eine ohne. Auf diese Weise konnte auch bei dieser Versuchsreihe die prozentuale Hemmung bestimmt werden. Die in Tab. 4 zusammengefaßten Werte

Tabelle 4

Wirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esteraseaktivität normaler und resistenter Spinnmilben.

Hemmung in %, bezogen auf die Aktivität ungehemmter Enzyme. Substrat: Acetylcholinchlorid in der Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ M. Gewebskonzentration: 132 mg/ml.

Hemmstoff	Hemmstoffkonzentration [mM]	Normale Tiere		Resistente Tiere		P
		% Hemmung	n	% Hemmung	n	
a) Phosphorsäureester						
Metasystox R	0,1	55,1 ± 1,6	5	10,9 ± 0,9	5	0,0002
Dibrom	0,2	56,0 ± 2,0	5	11,6 ± 1,7	5	0,0002
Gusathion A	0,2	54,5 ± 1,6	6	42,9 ± 2,2	5	0,002
b) Carbamate						
Formetanat	1,0	48,2 ± 3,7	5	42,8 ± 2,2	5	0,38
Formparanat	1,0	52,8 ± 2,2	6	42,0 ± 1,1	5	0,003
Mesurol	1,0	50,3 ± 1,6	5	52,0 ± 1,3	5	0,48

zeigen, daß Phosphorsäureester die Esterasen normaler Spinnmilben stärker hemmen als die resistenter Tiere. Die Unterschiede in der Hemmbarkeit sind in allen drei Fällen statistisch gesichert. Bei Anwendung von Carbamaten ergeben sich für die Wirkstoffe Formetanat und Mesurol keine signifikanten Unterschiede in der Esterasehemmung normaler und resistenter Milben. Für Formparanat dagegen resultiert ein geringer, aber signifikanter Unterschied in der Enzymhemmung der beiden Stämme. Bei allen drei Carbamaten mußten höhere Inhibitorkonzentrationen aufgewendet werden als bei Phosphorsäureestern, um im Normalstamm eine Enzymhemmung von etwa 50 % hervorzurufen.

E. Enzymkinetik

Wie die Ergebnisse der Hemmversuche zeigten, reagieren die Esterasen normaler und resistenter Spinnmilben auf bestimmte Hemmstoffe, wie z. B. Phosphorsäureester, in unterschiedlicher Weise. Der Frage nach einem abweichenden Verhalten der Enzyme im resistenten Stamm wird in den folgenden Versuchen weiter nachgegangen, indem die Acetylcholinesterase beider Stämme durch Bestimmen der Michaeliskonstanten näher charakterisiert wird. Die Hemmwirkung, die in beiden Stämmen durch Phosphorsäureester und Carbamate hervorgerufen wird, wird durch Ermitteln der Inhibitorkonstanten sowie durch Analyse des Hemmungstyps eingehender betrachtet. Es ist zu bedenken, daß bei allen Versuchen ein Enzymgemisch vorliegt, in welchem der Einfluß der Aliesterasen nicht auszuschalten ist, obwohl das für Cholinesterasen spezifische Substrat und die für sie günstige Substratkonzentration gewählt wurden. Es handelt sich daher bei den ermittelten Michaeliskonstanten und Hemmkonstanten um „scheinbare" Konstanten. Es ist damit nicht der Sinn dieser Untersuchungen, absolute Konstanten zu bestimmen, sondern es soll nach dem eventuellen Unterschied zwischen beiden Stämmen bezüglich ihrer Enzym- und Hemmkinetik gefragt werden.

a) Bestimmung der Michaeliskonstanten bei normalen und resistenten Tieren

Die Bestimmung der Michaeliskonstanten und der Maximalgeschwindigkeiten erfolgte nach dem graphischen Verfahren von Lineweaver-Burk. Im normalen Stamm ergab sich aus vier Einzelbestimmungen, von denen eine in Abb. 3 a dargestellt ist, ein durchschnittlicher K_m-Wert von 0,659 ± 0,041 mM und für V_{max} ein Mittelwert von 0,067 ± 0,003 µÄq/min. Bei resistenten Tieren wurde aus drei Einzelbestimmungen (eine davon ist in Abb. 3 b wiedergegeben) ein K_m von 0,773 ± 0,095 mM und ein V_{max} von 0,060 ± 0,005 µÄq/min ermittelt. Die statistische Nachprüfung ergab mit einem P-Wert von 0,26 im Fall

der Michaeliskonstanten und mit $P = 0{,}24$ für die Maximalgeschwindigkeiten, daß zwischen normalen und resistenten Milben keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf K_m und V_{max} bestehen. Das erscheint zunächst als Widerspruch zu den in Tab. 3 aufgeführten Ergebnissen, nach denen die Enzymaktivität bei normalen Spinnmilben signifikant höher ist als bei resistenten Tieren. Der bei diesen Messungen festgestellte Unterschied von etwa 30 % ist jedoch zu gering, um bei der hier verwendeten graphischen Bestimmungsmethode deutlich werden zu können. Es hätten wesentlich mehr als 3—4 Bestimmungen durchgeführt werden müssen, um auch nach dieser Methode eine solche Differenz in der Esteraseaktivität beider Stämme nachweisen zu können.

b) Bestimmung des Typs der Hemmung bei normalen Tieren

Es sollte hier untersucht werden, ob durch Phosphorsäureester und Carbamate Hemmwirkungen unterschiedlichen Typs hervorgerufen werden. Die graphische Analyse der durch Metasystox R und Formetanat verursachten Enzymhemmung ist in Abb. 4 und 5 wiedergegeben. Wie die graphischen Darstellungen zeigen, ist weder die Hemmung durch den Phosphorsäureester noch die durch das Carbamat ausgelöste Hemmung eindeutig dem kompetitiven oder dem nichtkompetitiven Hemmungstyp zuzuordnen, sondern die Hemmung ist in beiden Fällen vom „gemischten" Typ. Nach Webb (1963) kann man eine solche Hemmung dem einen oder dem anderen der beiden Hemmungstypen zuordnen, je nachdem welcher Achse des Koordinatensystems der Schnittpunkt der Geraden näher liegt. Für die durch Metasystox R hervorgerufene Hemmung ist aus Abb. 4 zu entnehmen, daß der Schnittpunkt der Geraden näher an der y-Achse liegt und die Unterschiede zwischen beiden V_{max} kleiner sind als die zwischen beiden Werten für K_m. Man kann demnach sagen, daß die Hemmung durch Metasystox R zum kompetitiven Hemmungstyp „tendiert". In Abb. 5 liegt der Schnittpunkt wesentlich näher an der Abszisse als an der Ordinate, und die Unterschiede für die K_m-Werte der gehemmten und ungehemmten Reaktion sind weit geringer als die zwischen den Werten für V_{max}. Die Hemmung durch Formetanat zeigt demnach eine Tendenz zum nichtkompetitiven Hemmungstyp.

c) Bestimmung der Inhibitorkonstanten bei normalen und resistenten Tieren

Die Bestimmung der Hemmkonstanten erfolgte graphisch nach dem Verfahren von Dixon (Abb. 6 und 7). Für den Hemmstoff Metasystox R wurde bei normalen Tieren aus drei Einzelbestimmungen ein durch-

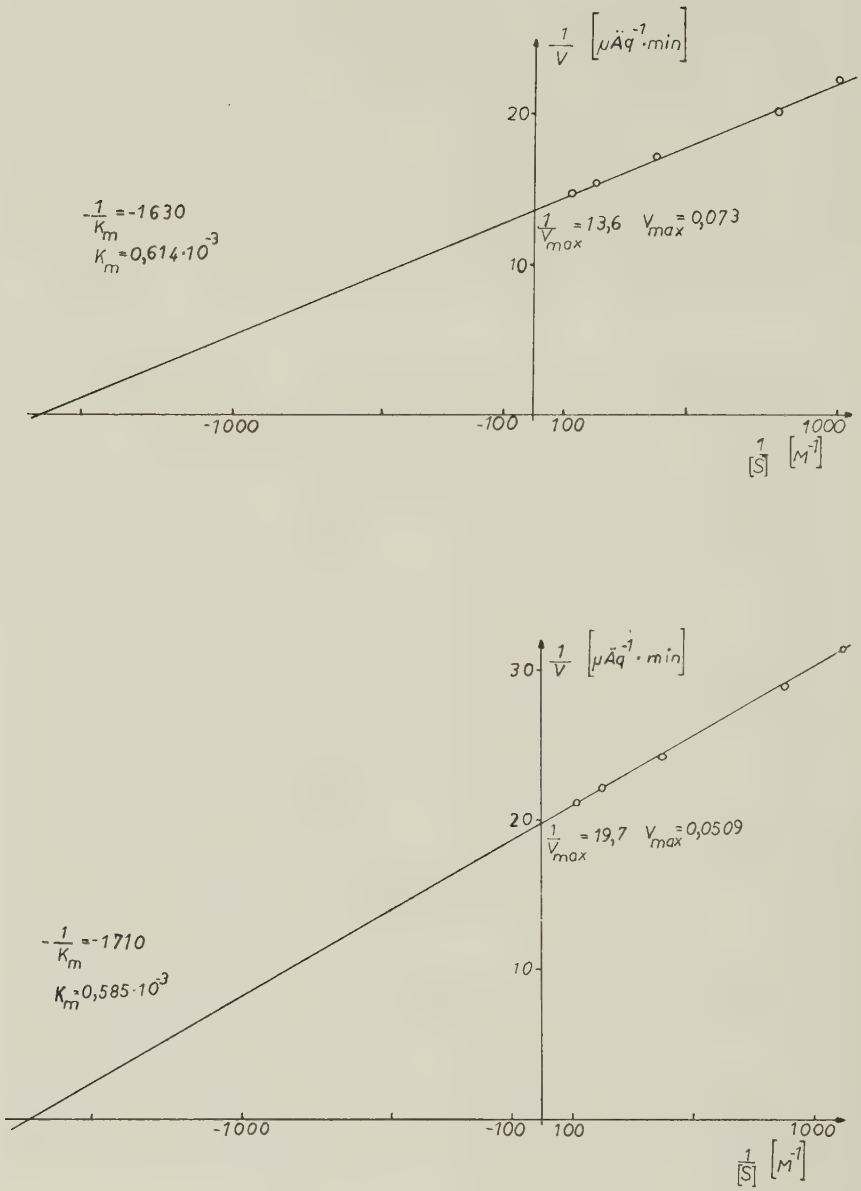


Abb. 3. Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m und der Maximalgeschwindigkeit V_{max} nach LINEWEAVER-BURK bei (oben) normalen und (unten) resistenten Spinnmilben: Substrat: Acetylcholinchlorid. Gewebskonzentration: 132 mg/ml.

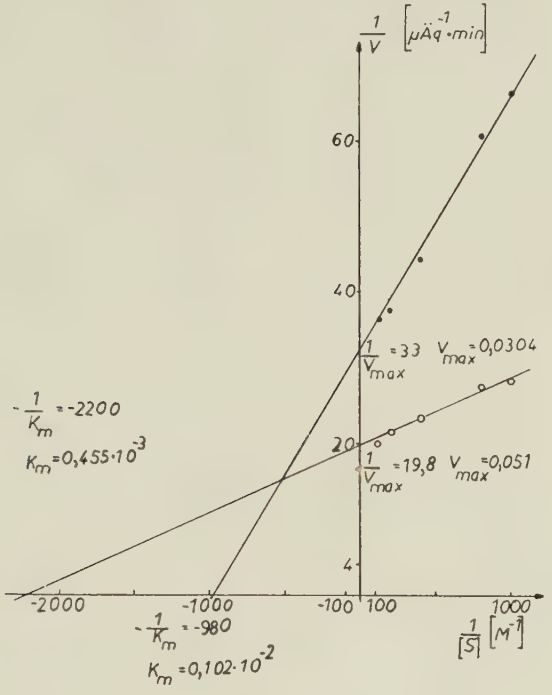


Abb. 4. Bestimmung des durch Metasystox R hervorgerufenen Hemmungstyps. Graphische Bestimmung von K_m und V_{max} für gehemmte (Punkte) und ungehemmte Reaktion (Kreise) nach Lineweaver-Burk. Substrat: Acetylcholinchlorid. Hemmstoffkonzentration: $1 \cdot 10^{-4}$ M. Gewebskonzentration: 132 mg/ml. Inkubationszeit: 10 min.

schnittlicher K_i-Wert von 0,112 ± 0,005 mM ermittelt, bei resistenten Tieren ergab sich, ebenfalls für n = 3, ein mittleres K_i von 0,322 ± 0,027 mM. Bei statistischer Analyse des Unterschiedes zwischen diesen beiden Mittelwerten ergab sich ein P-Wert von 0,002. Der Unterschied zwischen den Inhibitorkonstanten normaler und resistenter Milben für den Hemmstoff Metasystox R ist damit statistisch signifikant. Für den Hemmstoff Formetanat wurde die Inhibitorkonstante im normalen und resistenten Stamm je einmal bestimmt. Es ergab sich für normale Tiere ein K_i-Wert von 2,25 mM, für resistente Milben ein Wert von 1,95 mM. Aus diesen beiden Werten ist bereits zu ersehen, daß hier keine Unterschiede zwischen den Inhibitorkonstanten des normalen und resistenten Stammes vorliegen. Die Abweichungen zwischen beiden Werten liegen innerhalb der Fehlergrenzen.

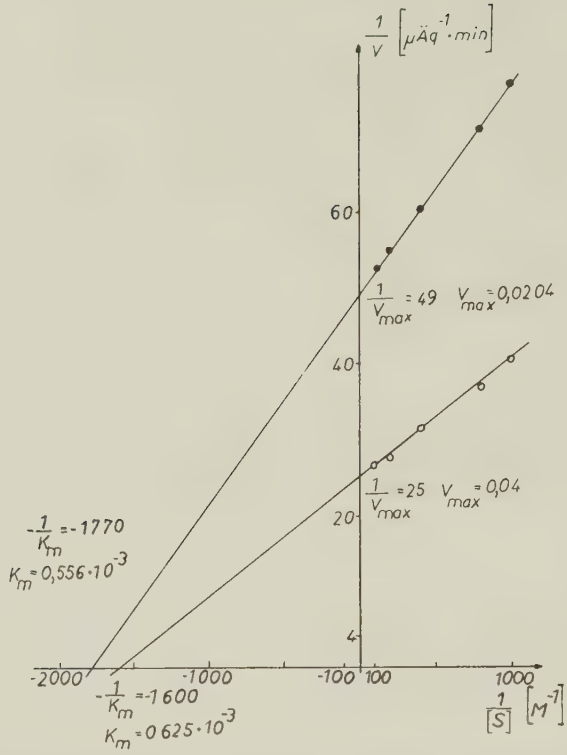
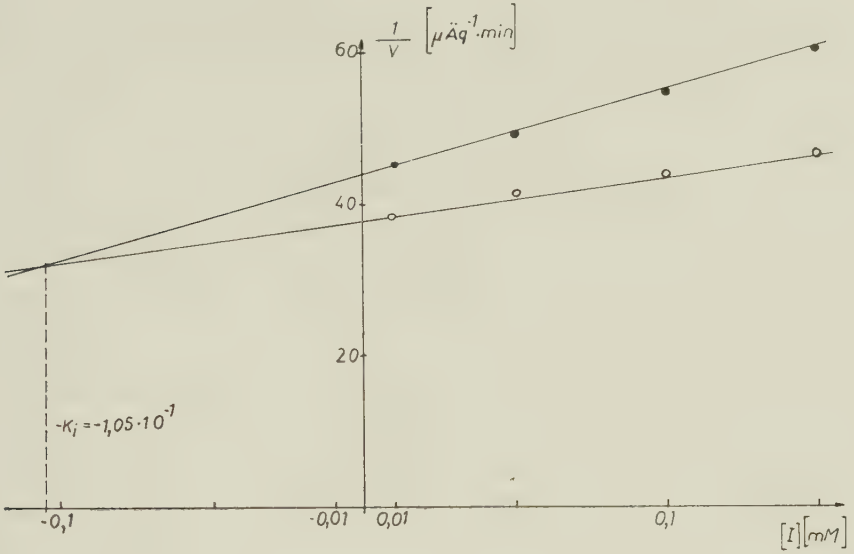


Abb. 5. Bestimmung des durch Formetanat hervorgerufenen Hemmungstyps. Hemmstoffkonzentration: $1 \cdot 10^{-3}$ M. (Übrige Daten wie bei Abb. 4.)

Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esterasen normaler und organophosphatresistenter Spinnmilben untersucht. Die durch diese Wirkstoffe hemmbaren Esterasen wurden differenziert und charakterisiert. Ihre Enzymaktivität in normalem und resistentem Stamm wurde verglichen.

Die Ergebnisse der Versuche zur Differenzierung und Charakterisierung der Esterasen stimmen weitgehend mit den Beobachtungen von Voss (1959, 1960, 1962) überein, der die Esterasebestimmungen bei *Tetranychus urticae* nach der manometrischen Methode von Warburg durchführte. Wie in seinen Arbeiten, so konnte auch hier durch Einsetzen spezifischer Substrate nachgewiesen werden, daß Acetylcholinesterase im Spinnmilbenhomogenat vorhanden ist. Den Verlauf der



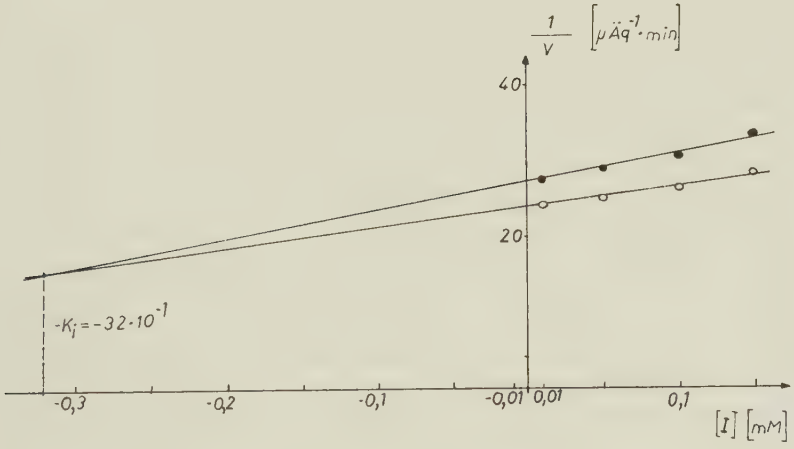
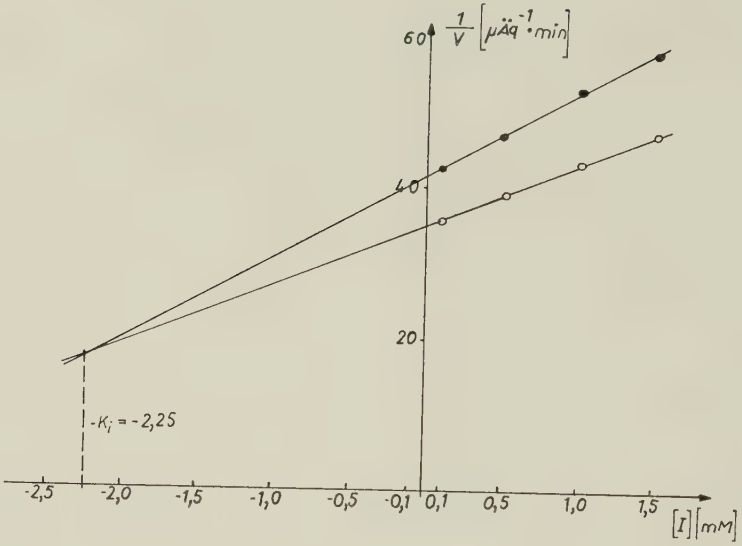


Abb. 6. Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_i für den Hemmstoff Metasystox R nach dem graphischen Verfahren von Dixon bei (oben) normalen und (unten) resistenten Spinnmilben. Substrat: Acetylcholinchlorid in den Konzentrationen $5 \cdot 10^{-2}$ M (Kreise) und $1 \cdot 10^{-3}$ M (Punkte). Inkubationszeit: 10 min. Gewebskonzentration: 132 mg/ml.



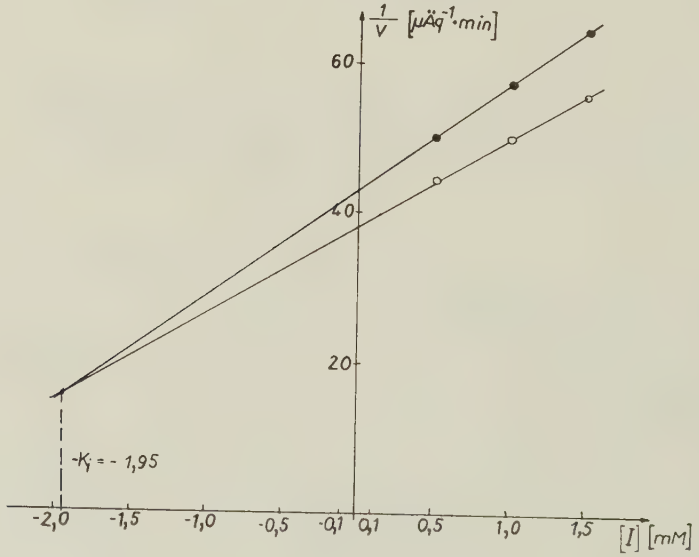


Abb. 7. Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_i für den Hemmstoff Formetanat bei (oben) normalen und (unten) resistenten Spinnmilben. Bis auf die erhöhte Hemmstoffkonzentration [I] gleiche Versuchsbedingungen wie bei K_i-Bestimmungen für Metasystox R.

Substratkonzentrations-Aktivitäts-Kurve beschreibt auch Voss als nicht typisch für die Acetylcholinesterase, ein Befund, der wohl durch das Vorhandensein eines Enzymgemisches im Rohhomogenat zu erklären ist. Besonders der Überschuß an Aliesterasen, auf den man aus der raschen Hydrolyse der Substrate Triactin, Phenylacetat und Methylbutyrat und aus dem Verlauf der pH-Aktivitäts-Kurve schließen kann, überdeckt die charakteristischen Eigenschaften und Wirkungen der Acetylcholinesterase. Auch SMISSAERT (1964) vertritt die Ansicht, daß bei Spinnmilben, wie bei anderen Arthropoden, eine „echte" Cholinesterase vorhanden ist, deren charakteristische Eigenschaften durch die Reaktion eines zweiten Acetylcholin-spaltenden Enzyms im Homogenat überlagert werden.

In den Ergebnissen der Cholinesterspaltung besteht ebenfalls Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Voss, wonach die Hydrolyse dieser Ester in der Reihenfolge Acetylcholin > Butyrylcholin > Acetyl-β-methylcholin > Benzoylcholin abnimmt. Entsprechendes ist auch von VAN ASPEREN (1959) für die Spaltung dieser Substrate durch die Esterasen im Fliegenhomogenat beschrieben worden. Es sind demnach bei Spinnmilben wie bei Insekten beide Cholinesterasen nachweisbar, wobei die Acetylcholinesterase offenbar in höherem Anteil vorliegt.

Weniger Übereinstimmung dagegen herrscht in den Ergebnissen der Versuche, die sich mit eventuellen Unterschieden in der Esteraseaktivität normaler und resistenter Spinnmilben befassen. Während Voss (1962) bei Anwendung der manometrischen Methode weder in der Cholinesterase- noch in der Aliesteraseaktivität Unterschiede zwischen normalen und resistenten Spinnmilben feststellen konnte, ist nach SMISSAERT (1964) die Cholinesteraseaktivität in normalempfindlichen Stämmen von *Tetranychus urticae* dreimal so hoch wie bei resistenten Milben, was der Autor mit Hilfe von drei verschiedenen Bestimmungsmethoden nachweist. SMISSAERT sieht in diesem Aktivitätsabfall einen Hinweis auf die Resistenzentstehung, indem er daraus auf eine mutierte Cholinesterase im organophosphatresistenten Stamm schließt. Bei den vorliegenden Versuchen wurden in Bezug auf Cholinesterase- und Aliesteraseaktivität Unterschiede zwischen normalen und resistenten Spinnmilben festgestellt. Die Aktivität beider Esterasen ist im resistenten Stamm im gleichen Ausmaß, d. h. um etwa 30 % vermindert. Es ist darin wohl weniger eine physiologische Verknüpfung mit der Resistenzentstehung zu sehen, als vielmehr ein Hinweis auf die allgemeine Vitalitätsverminderung der resistenten Tiere, die auch von DITTRICH (1961) beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der Hemmstoffversuche mit den Phosphorsäureestern bestätigen die von Voss und MATSUMURA (1964, 1965) und von SMISSAERT (1964, 1965) gemachte Feststellung, daß die Cholinesterase organophos-

phatresistenter Spinnmilben gegen Phosphorsäureester weitgehend unempfindlich sei. Die Autoren wiesen die veränderten Eigenschaften des Enzyms nach, indem sie die Hemmstoffe Diazoxon, Paraoxon und Malaoxon auf das zentrifugierte Homogenat normaler und resistenter Tiere einwirken ließen und anschließend die Enzymaktivität nach der Methode von HESTRIN prüften. Bei den vorliegenden Versuchen ergab sich, daß die Phosphorsäureester Metasystox R und Dibrom die Esteraseaktivität des normalen Stammes etwa fünfmal stärker hemmen als die Enzyme der resistenten Tiere. Auch mit dem Hemmstoff Gusathion A ließen sich signifikante Unterschiede in der Hemmbarkeit nachweisen, die allerdings wesentlich geringer waren als die Unterschiede, die für die anderen beiden Phosphorsäureester gefunden wurden. Das stimmt mit der im Freiland von KOLBE (1966) gemachten Beobachtung überein, daß Gusathion auch zur Bekämpfung phosphorsäureesterresistenter Milbenstämme noch mit Erfolg eingesetzt werden kann. VOSS und MATSUMURA (1964) stellten fest, daß die Unterschiede in der Esterasehemmung normaler und resistenter Milben mit steigender Substratkonzentration abnehmen und bei hohen Substratkonzentrationen schließlich nicht mehr nachweisbar sind. Das deutet darauf hin, daß die Veränderung der Acetylcholinesterase, die ja bei hohen Substratkonzentrationen nur noch eine geringe Aktivität zeigt, für die Unterschiede in der Hemmbarkeit ausschlaggebend ist. Die Aliesterasen, bei denen keine Substrathemmung auftritt, scheinen demnach im resistenten Stamm unverändert und für den hier diskutierten Resistenzmechanismus ohne Bedeutung zu sein. Für die Entstehung der Organophosphatresistenz von Hausfliegen sind sie dagegen nach VAN ASPEREN (1960), VAN ASPEREN und OPPENOORTH (1959) und OPPENOORTH und VAN ASPEREN (1961) von entscheidender Wichtigkeit. Es ist anzunehmen, daß die hier gefundenen Unterschiede in der prozentualen Hemmung größer ausgefallen wären, wenn die völlige Ausschaltung der Aliesterasen bei diesen Versuchen möglich gewesen wäre.

Läßt man die Malathion- und Parathionresistenz unberücksichtigt, die nach MATSUMURA und VOSS (1964) mit dem Abbau dieser Wirkstoffe durch Carboxyesterasen und Phosphatasen ihren eigenen spezifischen Resistenzmechanismus hat, so scheint bewiesen, daß eine wesentliche Ursache der Organophosphatresistenz bei Spinnmilben in einer Veränderung der Acetylcholinesterase zu suchen ist. Für diese Veränderung des Enzyms und damit für die Organophosphatresistenz der Tiere scheint ein einziger genetischer Faktor verantwortlich zu sein (TAYLOR und SMITH, 1965; HELLE, 1964; SCHULTEN, 1966; BALLANTYNE und HARRISON, 1967).

Es wurde im Verlauf dieser Arbeit versucht, die Veränderung der Acetylcholinesterase auch auf enzymkinetischem Wege nachzuweisen. Dabei lieferte die Bestimmung der Michaeliskonstanten keinen Beweis

für die Änderung des Enzyms im resistenten Stamm. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den K_m-Werten des normalen und resistenten Stammes gefunden. Dagegen konnten Voss und Matsumura (1965) eine 4- bis 5fache Erhöhung der Michaeliskonstanten im resistenten Stamm feststellen, also eine geringere Affinität der gegen Phosphorsäureester unempfindlichen Cholinesterase zum Substrat. Für die Maximalgeschwindigkeiten erhielten auch Voss und Matsumura in beiden Stämmen annähernd gleiche Werte.

Die Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i für den Hemmstoff Metasystox R erbrachte dagegen einen Beweis für die geringere Affinität der Cholinesterase des resistenten Stammes zum Organophosphat-Inhibitor. Die K_i-Werte, die sich für den resistenten Stamm ergaben, liegen etwa dreimal höher als die Inhibitorkonstanten für normale Milben. Zu der gleichen Aussage gelangten Voss und Matsumura (1965) bei der Bestimmung der Inhibitorkonstanten für Paraoxon bei normalen und resistenten Spinnmilben. Die Autoren fanden bei resistenten Tieren K_i-Werte, die etwa das 20fache der für den normalen Stamm bestimmten K_i-Werte betragen.

Bei den Hemmversuchen mit Carbamaten, gegen die bisher in der Praxis der Spinnmilbenbekämpfung kaum Resistenzerscheinungen auftraten, ergaben sich im Fall der Hemmstoffe Formetanat und Mesurol keine Unterschiede in der Esterasehemmung beider Stämme. Geringfügige Unterschiede wurden bei der Anwendung von Formparanat festgestellt, das die Esterasen normaler Tiere etwas stärker hemmt als die der resistenten.

Man kann daher annehmen, daß die Acetylcholinesterase beider Stämme Carbamaten gegenüber empfindlich ist, und kann weiterhin schließen, daß Carbamate demnach an einer anderen Stelle des Cholinesterasemoleküls angelagert werden als die Phosphorsäureester, gegen die das Enzym der resistenten Tiere eine Unempfindlichkeit entwickeln kann.

Auf solche verschiedenartigen Bindungsverhältnisse weist die graphische Analyse des durch die Hemmstoffe Metasystox R und Formetanat hervorgerufenen Hemmungstyps hin. Die graphischen Darstellungen lassen zwar in beiden Fällen eine eindeutige Zuordnung zu einem „reinen" Hemmungstyp nicht zu, sondern deuten auf eine „gemischte" Hemmung hin, doch ist zu erkennen, daß im Fall der Hemmung durch Metasystox R eine Tendenz zum kompetitiven Hemmungstyp besteht, während die Hemmung durch Formetanat zum nichtkompetitiven Hemmungstyp tendiert. Wenn man bedenkt, daß eine Hemmung „reinen" Typs ohnehin sehr selten auftritt und daß ferner den Bestimmungsmethoden das Vorliegen eines Enzymgemisches als störender

Faktor hinzukam, so sind die Unterschiede in der Hemmwirkung, die man aus den graphischen Darstellungen entnehmen kann, recht deutlich ausgeprägt.

Die Hemmversuche mit Carbamaten leiten ferner über zur Diskussion der negativen Kreuzresistenz bei Spinnmilben. Steinhausen (1968) fand bei zwei organophosphatresistenten Milbenstämmen in Spritzversuchen eine Empfindlichkeit gegenüber Formetanat, die 8 bis 12mal höher war als die Empfindlichkeit der normalen Milben diesem Wirkstoff gegenüber. Bei Anwendung anderer Carbamate konnte Steinhausen diese Beobachtung nicht bestätigen. Eine biochemische Erklärung dieses Phänomens durch Untersuchung der Esteraseaktivitäten konnte bei den vorliegenden Untersuchungen nicht erbracht werden. Obgleich der gleiche normale Stamm und auch einer der resistenten Stämme zu den Messungen verwendet wurde, die auch Steinhausen zu seinen Versuchen herangezogen hatte, ließen weder die Hemmversuche noch die hemmkinetische Prüfung den Schluß zu, daß das Auftreten dieser negativen Kreuzresistenz gegenüber Formetanat durch eine erhöhte Carbamatempfindlichkeit der Cholinesterase resistenter Spinnmilben zu begründen sei. Eine Veränderung des Wirkungsortes der Hemmstoffe kann damit nicht als Ursache der von Steinhausen gemachten Beobachtung angesehen werden. Ebenso scheiden Unterschiede im Verhalten beider Milbenstämme hier als Erklärungsmöglichkeit aus, da Steinhausen auch bei Anwendung des Objektträgertauchtestes, der von Voss (1963) beschrieben wurde, den Beweis für die stärkere Wirkung von Formetanat im resistenten Stamm erbringen konnte. Dagegen könnte eine Permeabilitätsänderung der Kutikula hier eine Rolle spielen. Es wäre denkbar, daß die Kutikula der organophosphatresistenten Milben in ihrem Bau und ihrer chemischen Zusammensetzung derart verändert ist, daß sie ein verstärktes Eindringen des Formetanats in den Milbenkörper ermöglicht. Die Tatsache, daß die negative Kreuzresistenz hier lediglich auf Formetanat beschränkt ist und sich nicht auch auf andere Carbamate erstreckt, legt eine solche Erklärung nahe. Ebenso könnte eine verminderte Speicherung im Fettgewebe dazu führen, daß bei resistenten Tieren das Carbamat stärker am Wirkungsort angehäuft wird als im normalen Milbenstamm.

Zur weiteren Klärung des Problems erscheint es daher sinnvoll, die hier dargestellten in-vitro-Versuche durch in-vivo-Experimente zu ergänzen, um so zu untersuchen, ob zwsichen normalen und resistenten Spinnmilben Unterschiede in der Intrabilität des Wirkstoffs bestehen. Weiterhin könnten Versuche mit C_{14}-markiertem Formetanat Aussagen über den Verbleib des Wirkstoffs im Organismus und über die möglicherweise unterschiedliche Anhäufung am Wirkungsort liefern.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Phosphorsäureestern und Carbamaten auf die Esteraseaktivität normaler und resistenter Spinnmilben der Gattung *Tetranychus* untersucht. Dabei ergab sich, daß Phosphorsäureester (z. B. Metasystox R und Dibrom) die Esterasen normaler Milben etwa fünfmal stärker hemmen als die der resistenten Tiere. Es wird angenommen, daß diese signifikanten Unterschiede in der Enzymhemmung auf eine Veränderung der Cholinesterase im resistenten Stamm zurückgehen. Dagegen zeigen die Carbamate Formetanat und Mesurol in beiden Milbenstämmen annähernd gleiche Hemmwirkung.

Es wurde versucht, diese Ergebnisse durch enzymkinetische Untersuchungen zu bestätigen. Dabei ergab die Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den Cholinesterasen beider Stämme. Die Inhibitorkonstante K_i für den Hemmstoff Metasystox R erwies sich dagegen bei resistenten Milben als signifikant größer als bei normalen Tieren. Für den Hemmstoff Formetanat ergaben sich in beiden Stämmen annähernd gleiche Werte für K_i.

Aus der graphischen Analyse der durch Metasystox R und Formetanat hervorgerufenen Hemmung konnte geschlossen werden, daß Phosphorsäureester und Carbamate mit unterschiedlichen Regionen des Cholinesterasemoleküls reagieren.

Die Erscheinung der negativen Kreuzresistenz gegenüber Formetanat konnte durch die vorliegenden Esterasebestimmungen nicht geklärt werden.

Summary

In the submitted research work the effect of phosphoric acid esters and carbamate insecticides on the esterase activity of normally susceptible and resistant spider mites of the *Tetranychus* species was examined. It was found that the esterase activity of normally susceptible mites was inhibited by phosphoric acid esters five times as much as the esterase activity of resistant animals. It can be assumed that these significant differences in the enzyme inhibition result in a change of the cholinesterase in the resistant strain. In contrast the carbamates Formetanate and Mesurol show in both strains nearly the same inhibiting effect.

It was attempted to confirm these results bz enzyme kinetic analysis. The determination of the Michaelis-constant however gave no indication of differences between the cholinesterases of both strains. The inhibitor-constant K_i for the inhibitor Metasystox R appeared to be significantly higher for resistant mites than for normally susceptible animals. For the inhibitor Formetanate in both strains nearly the same K_i was found.

From the graphical analysis of the inhibition caused by Metasystox R and Formetanate can be concluded that phosphoric acid esters and carbamates react with different regions of the cholinesterase molecule.

The negative cross-resistance against Formetanate could not be explained by the submitted esterase determinations.

Literatur

van Asperen, K. (1959): Distribution and substrate specifity of esterases in the housefly *Musca domestica*. — J. Ins. Physiol. *3*, 306—322.

van Asperen, K. und Oppenoorth, F. J. (1959): Organophosphat resistance and esterase activity in houseflies. — Entom. exp. appl. *2*, 48—57.

van Asperen, K. (1960): The interaction between Organophosphorus insecticides and esterases in homogenates of OP-susceptible- and resistant houseflies. — Entom. exp. appl. *3*, 68—83.

— (1960): Toxic action of Organophosphorus compounds and esteraseinhihibition in houseflies. — Biochemical. Pharmacol. *3*, 136—146.

Ballantyne, G. H. und Harrison, R. A. (1967): Genetic and biochemical comparisons of Organophosphat resistance between strains of spider mites. — Entom. exp. appl. *10*, 231—239.

Belitz, H. J. (1960): Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. — Mathematikunterricht *3*, 83—103.

Dittrich, V. (1961): Populationsgenetische Untersuchungen an normalen und phosphorsäureesterresistenten Stämmen von *Tetranychus urticae* Koch. — Z. angew. Entomol. *48*, 34—57.

Hardegg, W. (1966): Cholinesterasen — In: Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Bd. VI/B 921—962, 10. Aufl. — Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.

Helle, W. (1965): Resistance in the Acarina mites. — Adv. Acarol. *2*, 271—293.

Kolbe, W. (1966): Untersuchungen über die Bekämpfung resistenter Spinnmilbenstämme im Hopfenbau. — Pflanzenschutznachr. Bayer 19, 247—281.

Matsumura, F. und Voss, G. (1964): Mechanism of Malathion- and Parathion-resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. — J. Econ. Ent. 57, 911—917.

Oppenoorth, F. J. and van Asperen, K. (1961): The detoxication enyzmes in the housefly. — Entom. exp. appl. *4*, 311—333.

Schulten, G. G. M. (1966): Genetics of resistance to Parathion and Demeton-S-methyl in *Tetranychus urticae* Koch. — Genetica 37, 207—217.

Smissaert, H. (1964): Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to Organophosphates. — Science *143*, 129—131.

— (1965): Cholinesterases in spider mites susceptible and resistant to Organophosphates. — Boll. Zool. agr. Bachic. *2*, 271—273.

Steinhausen, W. (1968): Akarizid zur Bekämpfung phosphorsäureesterresistenter Spinnmilben mit durch Resistenz erzeugter höherer Empfindlichkeit. — Z. angew. Zool. 55, 107—114.

Taylor und Smith (1956): Transmission of resistance between strains of two-spottet spider mites. — J. Econ. Ent. *49*, 858—859.

Voss, G. (1959): Esterasen bei der Spinnmilbe *Tetranychus urticae*. — Naturwiss. *46*, 652.

— (1960): Esterasen bei der Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch. — Naturwiss. *47*, 400—401.

— (1961): Ein neues Akarizid-Austestungsverfahren für Spinnmilben. — Anz. Schädlingsk. *34*, 76—77.

— (1962): Physiologische und toxicologische Untersuchungen an der Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch unter besonderer Berücksichtigung eines phosphorsäureesterresistenten Stammes. — Dissertation.

Voss, G. und Matsumura, F. (1964): Resistance to Organophosphorus compounds in the two-spottet spider mite: Two different mechanisms of resistance. — Nature *202*, 319—320.

— (1965): Biochemical studies on a modified and normal Cholinesterase found in Leverkusen stains of the two-spottet spider mite *Tetranychus urticae*. — Canad. J. Biochem. *43*, 63—72.

Voss, G., Dautermann, C. und Matsumura, F. (1964): Relation between toxicity of Malathion analog and Organophosphate resistance in the two-spottet spider mite. — J. Econ. Ent. *57*, 808—811.

Webb, J. L. (1963): Enzyme and metabolic inhibitors Bd. 1. — New York - London: Academic Press.

Anschrift der Verfasserin:
Dörte Schöneich
2804 Bremen-Lilienthal
Jürgen-Christian-Findorffstr. 16 b

Die Zeitschrift für angewandte Zoologie bringt Originalabhandlungen, Kleine Mitteilungen und Buchbesprechungen aus dem Gesamtgebiet der angewandten Zoologie. Sie erscheint mit vier Heften jährlich.

Den Originalbeiträgen sollten stets kurze Zusammenfassungen in deutscher und in englischer Sprache (zusammen höchstens eine Seite lang) angefügt werden.

Die Manuskripte werden in Maschinenschrift auf nur einseitig beschriebenen Blättern erbeten. Vorgesehener S p e r r d r u c k (Texthervorhebungen) möge mit durchbrochener Unterstreichung, *Kursivdruck* (wissenschaftliche Art- und Gattungsnamen) mit geschlängelter, **Halbfettdruck** (Überschriften) durch doppelte Unterstreichung und Satz in KAPITÄLCHEN (Autorennamen, außer hinter latein. Artnamen) durch GROSSBUCHSTABEN oder durch Unterstreichen in grüner Farbe gekennzeichnet werden.

Es muß dringend gebeten werden, den Text so knapp wie möglich zu halten und weniger wichtige Teile (Methodik, Protokolle u. dgl.) durch einen senkrechten Strich am linken Rand für Kleindruck vorzusehen. Die Beigabe von Tabellen, Kurven und Abbildungen sollte auf das unbedingt Notwendige beschränkt und Seitenhinweise im Text sollten tunlichst vermieden werden.

Die Abbildungsvorlagen müssen sich zur Wiedergabe durch Strichätzung (Federzeichnungen in Tusche) oder durch Autotypie (möglichst scharfe, kontrastreiche Lichtbilder, evtl. auch „fixierte" Bleistift- und Halbton-Tuschezeichnungen) eignen. Sie sind vom Text gesondert einzuliefern und sollten auf der Rückseite den vorgeschlagenen Verkleinerungsmaßstab sowie den Namen des Einsenders tragen. Die Abbildungsunterschriften (Legenden) sind auf besonderen Blättern zusammenzustellen.

Die Verfasser werden — auch in ihrem eigenen Interesse — gebeten, die Korrektur der Fahnenabzüge mit äußerster Sorgfalt und so bald wie möglich durchzuführen und keine größeren Änderungen gegenüber dem Manuskript vorzunehmen. Der Verlag ist berechtigt, dem Autor die Korrekturkosten in Rechnung zu stellen, soweit sie 10 % der Satzkosten übersteigen. Beim Korrekturlesen wird empfohlen, die im „Duden" veröffentlichten, genormten Korrekturzeichen zu verwenden. Die Revision der Umbruchabzüge wird, wenn es vertretbar erscheint, von der Schriftleitung vorgenommen.

Die Mitarbeiter erhalten 30 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere Sonderdrucke können gegen Berechnung geliefert werden, wenn sie rechtzeitig (spätestens bei Rücksendung der Fahnenkorrektur) beim Verlag bestellt werden.

Das Autorenhonorar beträgt 30,— DM für den 16seitigen Bogen, jedoch höchstens 90,— DM für eine Arbeit. Der Raum für „Entgegnungen", Buchbesprechungen, Abbildungen und Tabellen wird nicht honoriert.

Einsendung von Besprechungsexemplaren selbständig erscheinender Werke aus dem Gebiet der angewandten Zoologie ist erwünscht.

Das Verlagsrecht an allen Beiträgen geht mit der Veröffentlichung auf den Verlag über.

Der Verlag
Duncker & Humblot
1 Berlin 41, Dietrich-Schäfer-Weg 9
Postfach 330

Die Schriftleitung
Dr. K. Becker
1 Berlin 33, Corrensplatz 1

Phytopathogene Viren und ihre Überträger. Phytopathogenic Viruses and their Vectors. Von Dr. *Kurt Heinze*. 291 S. 1959. DM 56,—.

Die Schädlinge, Krankheiten und Schädigungen unserer Hackfrüchte (Kartoffeln und Rüben). Von Dr. *Kurt Heinze*. XVI, 367 S. mit 189 Abb. 1953. Ln. DM 48,—.

Die tierischen Schädlinge unserer Gewächshauspflanzen, ihre Lebensweise und Bekämpfung. Von Dr. *Hans Peter Plate* und *Ewald Frömming*. 288 S. mit 126 Abb. 1953. Ln. DM 26,80.

Kampf um Milliarden. Ein Tatsachenbericht vom Kampf gegen schädliche Tiere und Pflanzen. Von *Walter Jancke*. 196 S. mit 60 Abb. 1955. Ln. DM 18,60.

Myiasis des Auges. (Sonderdruck aus Zeitschrift für angewandte Zoologie). Von Dr. *A. Krümmel* und Dr. *A. Brauns*. 66 S. 1956. DM 16,—.

Vierzig Jahre Vorratsschutz in Deutschland. Eine Auswahl aus Zeitschriftenaufsätzen und Tagungsvorträgen. Von *Friedrich Zacher*. Herausgegeben und eingeleitet von Herbert Weidner. 143 S. 1963. Ln. DM 18,—.

Holz und Organismen. Internationales Symposium Berlin-Dahlem 1965. Herausgegeben von Prof. Dr. *Günther Becker* und Prof. Dr. *Walter Liese*. 543 S. mit 148 Abb. 1966. DM 186,—.

Verhalten und Schutz von Holzspanplatten und anderem Plattenmaterial gegen Organismen. IUFRO-Symposium London 1969. Herausgegeben von Prof. Dr. *Günther Becker* und Prof. Dr. *Karel Griffioen*. 142 S. 1969. DM 54,—.

Das Verhalten unserer Schnecken zu den Pflanzen ihrer Umgebung. Von *Ewald Frömming*. 348 S. mit 47 Abb. 1962. Ln. DM 78,60.

Biologie der mitteleuropäischen Süßwasserschnecken. Von *Ewald Frömming*. 313 S. mit 101 Abb. 1956. Brosch. DM 58,—; Ln. DM 64,—.

Biologie der mitteleuropäischen Landgastropoden. Von *Ewald Frömming*. 404 S. mit 60 Abb. 1954. Brosch. DM 64,—; Ln. DM 69,—.

Einführung in die Meeresbiologie. Von Prof. Dr. *Helmuth Hertling*. Nach dem Tode des Verfassers besorgt von Prof. Dr. *Konrad Herter*. 215 S. mit 80 Abb. 1953. DM 36,—.

Der Temperatursinn der Insekten. Von Prof. Dr. *Konrad Herter*. 378 S. mit 130 Abb. und 32 Tab. 1953. DM 66,—.

DUNCKER & HUMBLOT / BERLIN